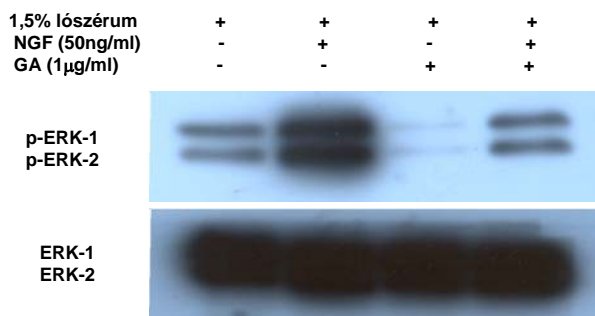


A pályázati munkatervnek megfelelően a támogatott kutatás a PC12 phaeochromocytoma sejtek differenciációs, stressz és apoptotikus jelátvitelének különböző vonatkozásaival foglalkozott. A munka egyes elemei az ETT 073/2001 és az INTAS 51022 kutatási programokkal közösen folytak. A kutatás során nehézséget jelentett a munkacsoportunkat érintő fluktuáció: több kutatónk ideiglenesen (Pap Marianna, Kiss Katalin, Fekete Zsuzsanna) vagy véglegesen (Boglári Gábor, Nusser Nóra, Panta Zoltán, Salamon Szilvia) távozott a programból. A munkacsoporthoz csatlakozó fiatal, tapasztalatlan kutatók betanítása a vártnál több időt és energiát igényelt (Bátor Judit, Berta Gergely, Schipp Renáta, Stark Borbála). Részben ez magyarázza a zárójelentés késését. A végzett munka eredményeinek egy részét még nem publikáltuk tudományos folyóiratokban (geldanamycin-, proteaszóma-, farnezilációs, nitrozilációs anyag, RhoA-alprojekt). Ezeknek az eredményeknek a közzlése a közeljövőben várható. Kérem ezért a kutatási program záróértékelésének 2 év múlva történő felülvizsgálatát.

A szakmai beszámolóban a folyóiratcikk formájában még nem publikált alprojektek legfontosabb kísérleti eredményeit ábrák formájában is bemutatjuk. A már megjelent közlemények anyaga ábrákat nem tartalmaz a beszámolóban.

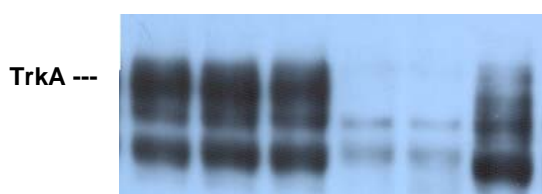
1. Az ERK-aktiváció és nukleáris transzlokáció jelentőségének vizsgálata

Laboratóriumunk 15 éve vizsgálja a Ras/B-Raf/MEK/ERK jelpálya jelentőségét és szabályozását PC12 sejtek differenciációs és túlélési jelátvitelében. Jelen kutatás egyik célja a PC12 sejtekben is expresszáldó Hsp90 és Grp94 hősokk fehérjék neuronális differenciációban és sejt túlélésben játszott szerepének tanulmányozása volt. Ezek a chaperone fehérjék specifikus jelátviteli fehérjék megkötésével szignalizációs multiprotein komplexeket hoznak létre. PC12 sejtek kezelése a Hsp90-gátló geldanamycinnel (1 µg/ml, 24 órával az NGF adása előtt) kivédi az NGF ERK-foszforylációt stimuláló hatását, sőt az ERK1 és 2 enzim alapfoszforylációját is csökkenti (1. ábra), anélkül, hogy befolyásolná ezen enzimek, illetve a jelátvitelben



1. ábra: Geldanamycin gátolja az ERK-foszforylációt PC12 sejtekben (24 h geldanamycin előkezelés, 10 perc NGF kezelés).

1,5% lószérum	+	+	+	+	+	+
NGF (50ng/ml)	-	+	-	-	+	-
MG 132 (2,5 µM)	-	-	+	-	-	+
GA (1µg/ml)	-	-	-	+	+	+

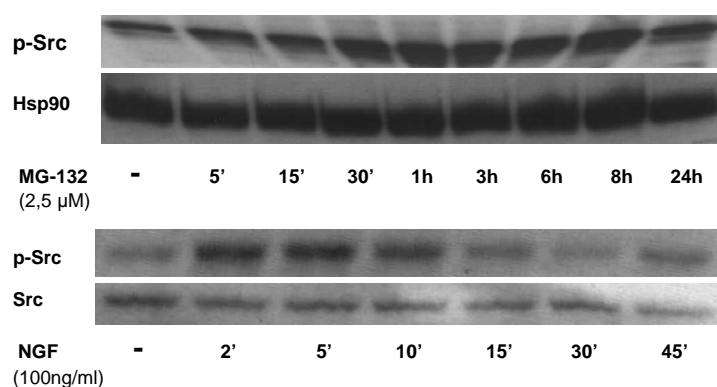


2. ábra: Geldanamycin csökkenti a TrkA-szintet PC12 sejtekben, proteaszomális TrkA-degenerációt okozva (24 h geldanamycin előkezelés, 10 perc NGF kezelés).

tőlük proximálisan elhelyezkedő MEK-1, B-Raf, c-Raf és H-Ras, valamint a chaperone fehérjék (Hsp90, Grp94) szintjét. Geldanamycin hatására viszont 24 óra alatt jelentősen csökken az NGF-receptor TrkA fehérje mennyisége. Ez a gátló hatás csaknem teljesen kivédhető a proteaszóma-gátló MG-132 (2.5 µM) egyidejű adásával (2. ábra). Leírt kísérleteink eredménye arra utal, hogy a TrkA-receptor Hsp90-védelemben részesül, a komplex felbomlása a receptor szelektív proteaszomális degradációjához vezet. A

kísérleteinkben alkalmazott nagy koncentrációjú geldanamycin (1 $\mu\text{g/ml}$) apoptotikus sejthalált okoz, melyet a proteinkináz R proteolitikus aktivációja előz meg.

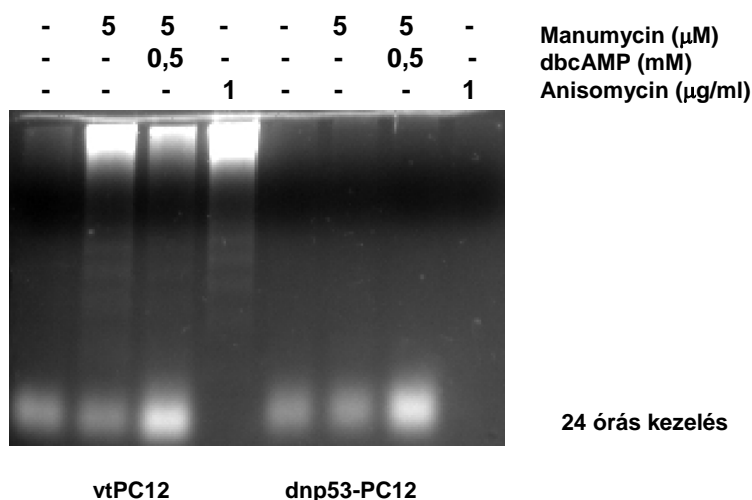
A proteasóma-gátlók bizonyos jelátviteli hatásai (neuritnövekedés serkentése, elhúzódó ERK-aktiváció) már korábban ismertek voltak. MG-132 (2.5 μM) hasonló kinetikával stimulálja a Src fehérje foszforilációját is (3. ábra; az NGF hatása sokkal gyorsabb és átmeneti) anélkül, hogy expresszióját befolyásolná. A hatást neuritnövekedés kísérli, a P-Src a citoplazmában lokalizálódik. PP-1 és PP-2 specifikus Src-gátlók mind az MG-132 neuritogén, mind pedig Src-foszforilációt stimuláló hatását kivédik. Az NGF-receptor (és/vagy más jelátviteli fehérjék) stabilizációja tehát fontos eleme az NGF-jelátvitel folyamatainak. (A geldanamycin, illetve proteasóma-gátlók jelátviteli hatásaival kapcsolatos kísérletek képezték az alapját Berta Gergely és Stark Borbála diplomamunkájának.)



3. ábra: MG-132 és NGF kezelés hatása a Src-foszforilációra.

(inaktív leptomycin B prepa-rátum?, PC12 sejtjeink leptomycin B-rezisztenciája?).

A Ras/ERK-út szignalizációs jelentőségét egy másik experimentális megközelítéssel is teszteltük (ez a munka egy INTAS-kollaboráció részét is képezte). A Ras fehérjék C-terminális végének farnilizációja szükséges membránkötődésükhöz és így jelátviteli aktivitásukhoz. Másrészt a 118. pozícióban levő cisztein nitrozilálódhat, ami serkenti a Ras•GTP komplex kialakulását, így a Ras fehérje aktivációját. A Ras kémiai módosulásainak



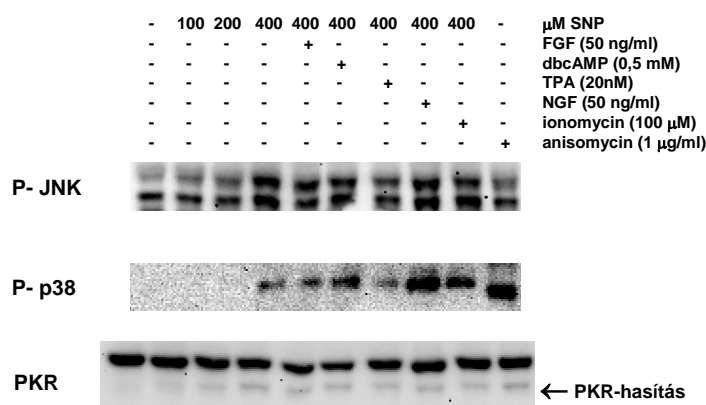
4. ábra: Internukleoszomális DNS-fragmentáció vtPC12 és dnp53-PC12 sejtekben (24 órás kezelés).

Az ERK nukleáris transzlokációjának jelentőségét a nukleáris fehérjeexportot gátló leptomycin B segítségével kívántuk tanulmányozni. Ezek a kísérleteink sikertelennek bizonyultak: az általunk használt leptomycin B sem a vizsgált koncentrációkban (10-20 nM), sem az alkalmazott kezelési időtartamokkal (90-180 perc, 1-3 nap) nem befolyásolta az ERK enzimek sejten belüli lokalizációját. Ennek okát nem tudjuk

hatását a szignalizációs folyamatokra gátló- és serkentőszerek alkalmazásával vizsgáltuk. Manumycin (farnesil-transzferáz inhibitor) nem-toxikus (3 μM) koncentrációja csekély mértékben serkentette az NGF-által indukált neuritnövekedést, illetve az ERK és Akt fehérjék foszforilációját és emelte a differenciációhoz ugyancsak szükséges ciklin D1 és p21 szintet. Ezeket a hatásokat Ras-gátlás nem közvetíthette, hiszen a dnRas-t expresszáló PC12 sejtvonalainkban az NGF

ilyen hatásai teljesen hiányoznak és manumycinre sem reagálnak. Nagyobb manumycin koncentráció (5 μ M) toxikus, apoptotikus DNS-fragmentációt okoz, nemcsak a vad-típusú (vt) PC12 sejtekben, de a dnRas, illetve dnp53 fehérjét expresszáló sejtvonalakban is (4. ábra). Kollaborációs partnereink ugyanakkor, dnRas-t és c-Ras-t fokozottan expresszáló PC12 sejtvonalainkat használva, kimutatták, hogy a szérumeheztes okozta apoptózis során fokozódó homociszteintermelés Ras-függő mechanizmussal szabályozódik (Barbakadze és mtsai, 2005).

A fehérjenitroziláció serkentésére az NO-donor nitroprusszid-nátriumot (SNP, sodium-nitroprusside) használtuk. Nem-toxikus koncentrációban (5-100 μ M) az SNP dózis-függő módon részlegesen gátolja az NGF-indukált neuritnövekedést, az NGF-receptorról kiinduló jelátviteli utakat (ERK, Akt) azonban alig befolyásolja. dnRas-t expresszáló sejtvonalban NGF-el együtt sem aktiválja a differenciációs jelátvitelt. Toxikus koncentrációban

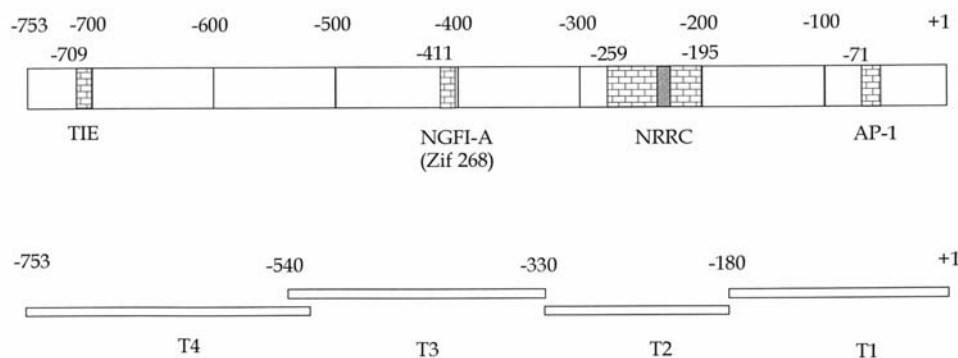


5. ábra: SNP serkenti a stressz-hatást közvetítő fehérjekinázokat (24 órás kezelések).

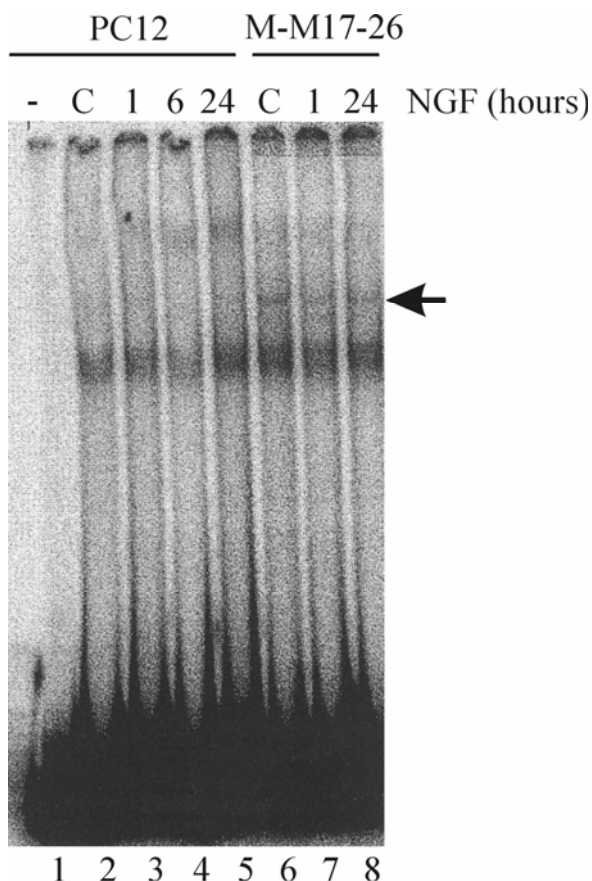
(>100 μ M) dózisfüggő módon apoptózist indukál, ezt a stresszkinázok (JNK, p38 MAPK, PKR) aktivációja kíséri (5. ábra). Mivel a fehérjefarneoziláció és -nitroziláció számos fehérjét érinthet, ezen folyamatok farmakológiai befolyásolásával nyert eredményeink igazolják ugyan szerepüket a túlélési jelátvitelben, a fő célfehérje azonban valószínűleg nem a Ras, azonosítása még várat magára. (A fehérjenitrozilációs munkából készítette el Varga Judit diplomamunkáját.)

2. A tranzin promoter NGF-szabályozásának vizsgálata

Célul tűztük ki a késői válasz gének közé tartozó tranzin gén promoterében levő Ras-függő szabályozóelem azonosítását. Ennek érdekében négy PCR-terméket készítettünk, melyek együttesen lefedték az expresszió szabályozásában szerepet játszó mintegy 750 bp hosszú régiót (6. ábra). Az 5'-végen 32 P-jelölt DNS-fragmentumokkal gélretardációs vizsgálatokat végeztünk vtPC12, Z-M17-5 (dnRas-t alacsony szinten expresszáló sejtvonal) és M-M17-26 (erős dnRas expressziójú sejtvonal) sejtekből, NGF-kezelés után, illetve anélkül izolált sejtmagextraktumokkal.



6. ábra: A tranzin promoter szerkezete és a gélretardációs assayhez használt PCR-termékek (T1-T4).



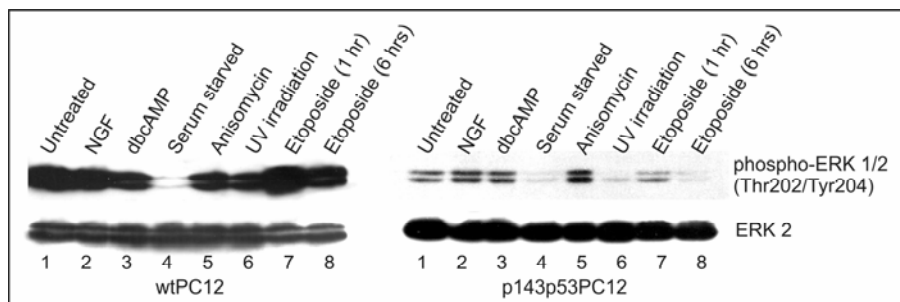
7. ábra: Fehérjekötődés vizsgálata a T2 fragmentumon PC12 (2-5. minta) és M-M17-26 sejtekből (7-9. minta) származó magextraktummal (1. minta: fehérjementes kontroll; a nyíl a dnRas klónokra specifikus komplexet mutatja).

Az EMSA-kísérletek az alábbi eredményeket hozták: (I) mind a négy DNS-fragmentumon kialakultak specifikus fehérje-komplexek, ezek különböző kísérletekben reprodukálhatóak voltak; (II) a legerősebb fehérjekötődést a T1 fragmentum adta, ezt NGF PC12-ben indukálta, a dnRas klónokban nem; (III) a T2 fragmentumon többféle fehérjekomplex képződött, közülük egy a dnRas klónokra specifikus (7. ábra); (IV) a T3 fragmentumon is kimutatható dnRas klónokra specifikus kötődés.

A témában eddig jutottunk. Bár ezek az első eredmények biztatóak, belőlük érdemi következtetések nem vonhatók le. A DNáz footprinting módszert, melytől a fehérjekötő helyek pontos lokalizálását vártuk, még nem tudtuk beállítani. A témán több, az intézetből azóta eltávozott kolléga kezdett dolgozni, érdemi eredményeket Fekete Zsuzsanna produkált, 2005 nyarán azonban ő is hosszabb külföldi tanulmányútra távozott. Az alprojektben elért csekély haladást a téma technikai nehézségei mellett a fenti tényezők magyarázzák.

3. Az NGF antimitogén hatásának vizsgálata

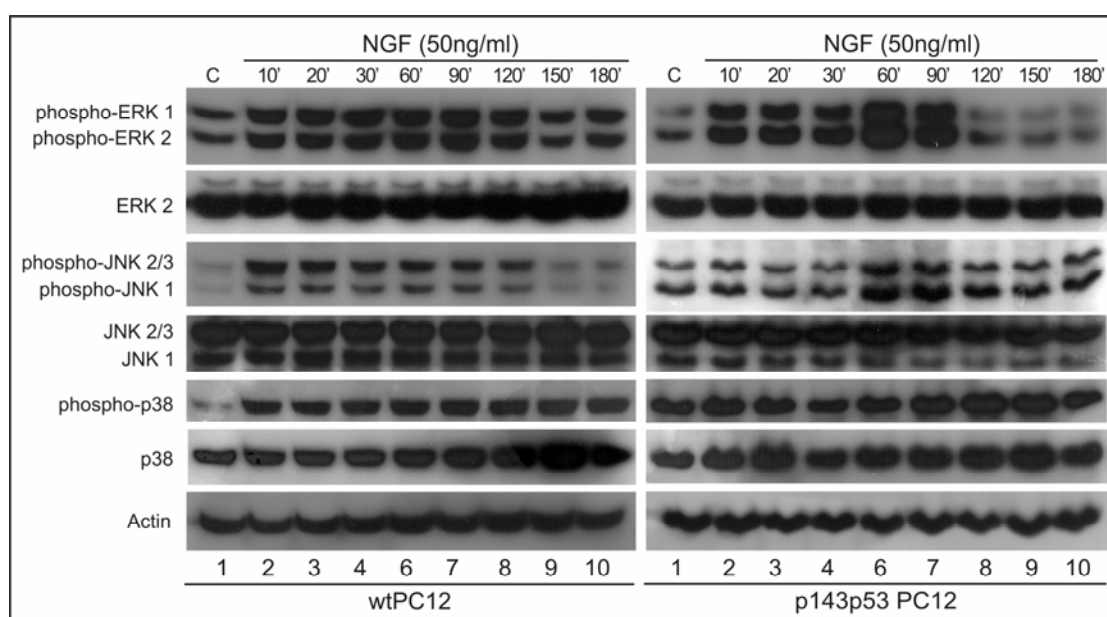
PC12 sejtek neuronális differenciációját megelőzi a sejtek kilépése a sejtciklusból, a proliferáció NGF által előidézett leállása. Az NGF antimitogén és differenciációs hatásának kapcsolatában megvizsgáltuk a p53 tumor szuppresszor fehérje szerepét. A p53 fehérje, egyéb hatásai mellett, Cdk-inhibitorok indukciójával sejtosztódást gátló hatást is kifejt. A p53



8. ábra: ERK-1 és -2 foszforiláció szinkronizálatlan wtPC12 és p143p53PC12 sejtekben.

fehérje szerepének tanulmányozására egy domináns negatív mutáns p53 (dn-p53) fehérjét stabilan expressező sejtvonalat izoláltunk (p143 p53PC12 sejtek). Ezek a sejtek teljesen rezisztensek az NGF neuritogén

hatására és NGF jelenlétében is tovább szaporodnak. Jelentős mennyiségben expresszálják az exogén p53 fehérjét, sejtmagjukban pedig erősen csökkent a p53-enhancerhez kötődő aktivitás. A p53 DNS-hez kötődését a vizsgált neuritogén (NGF, dbcAMP) és celluláris stresszt kiváltó kezelések (szérum-éheztetés, etopozid, UV-besugárzás, anisomycin) sem fokozták. Bár a p53 fehérje transzkripciós faktor funkcióját tehát jelentősen befolyásolja a mutáns fehérje jelenléte, a p53 fehérje foszforilációs mintázata (a Ser6, 15, 20, 46 és 392 pozíciókban) csak csekély mértékben tér el a vtPC12 és p143p53PC12 sejtekben. A kétféle sejtvonal eltérő biológiai sajátosságait azonban nagyon jól tükrözi MAPK-kaszkádjuk eltérő viselkedése. Irodalmi adatok tanúsága szerint a Ras/ERK-út szabályozza a p53 funkciót. Saját vizsgálataink bizonyítják, hogy reguláció ellentétes irányban is létezik. Szinkronizálatlan p143p53PC12 sejtekben az ERK-foszforiláció erősen gátolt (8. ábra). G₀ fázisú p143p53PC12 sejtekben az NGF hatásosan stimulálja az ERK-foszforilációt, az azonban 120 perc után már visszatér az alapszintre, míg a vtPC12 sejtekben 180 perc után is emelkedett mértékű (9. ábra). A JNK 1, 2, 3 és a p38 MAPK foszforiláció erőteljesebb és konstitutív a dnp53 fehérjét



9. ábra: Mitogén-aktivált proteinkinázok foszforilációja NGF-kezelt vtPC12 és p143p53PC12 sejtekben.

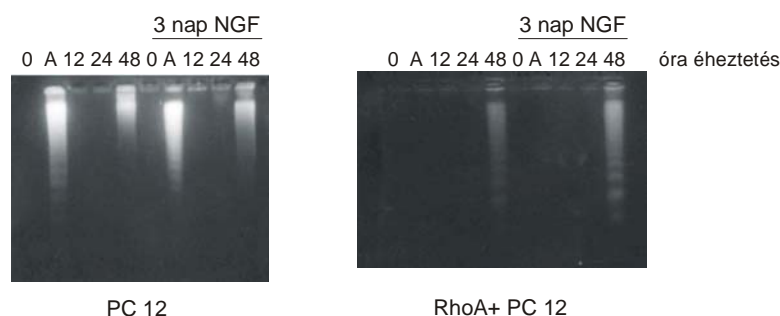
expresszáló sejtekben. Mindkét jelenség (átmeneti ERK-foszforiláció, fokozott stresszkináz aktivitás) gátló hatású az NGF neuritogén jelátviteli mechanizmusában. (A dnp53-munka részleteit Fábián és mtsai, 2006 cikke tartalmazza. Ez az anyag részét képezi Fábián Zsolt PhD-disszertációjának, melynek védeke 2006 szeptemberében várható.)

4. Túlélési és pro-apoptotikus jelátvitel PC12 sejtekben

Jelen program fontos részét képezte a túlélési és sejthalál-szignalizáció néhány vonatkozásának vizsgálata PC12 sejtvonalakban.

A Ras szupercsaládba tartozó monomer G protein RhoA szerepét olyan stabil PC12 transzfektáns klónokban vizsgáltuk, melyek konstitutívan aktív mutáns RhoA (V14RhoA) fehérjét expresszáltak. Hoechst-festést követő morfológiai vizsgálatok és az internukleoszomális DNS-fragmentáció analízise is azt mutatta, hogy szérum-éheztetést illetve PI3K-gátlást (LY294002, wortmannin) követően is apoptotikus jelek mutatkoznak a

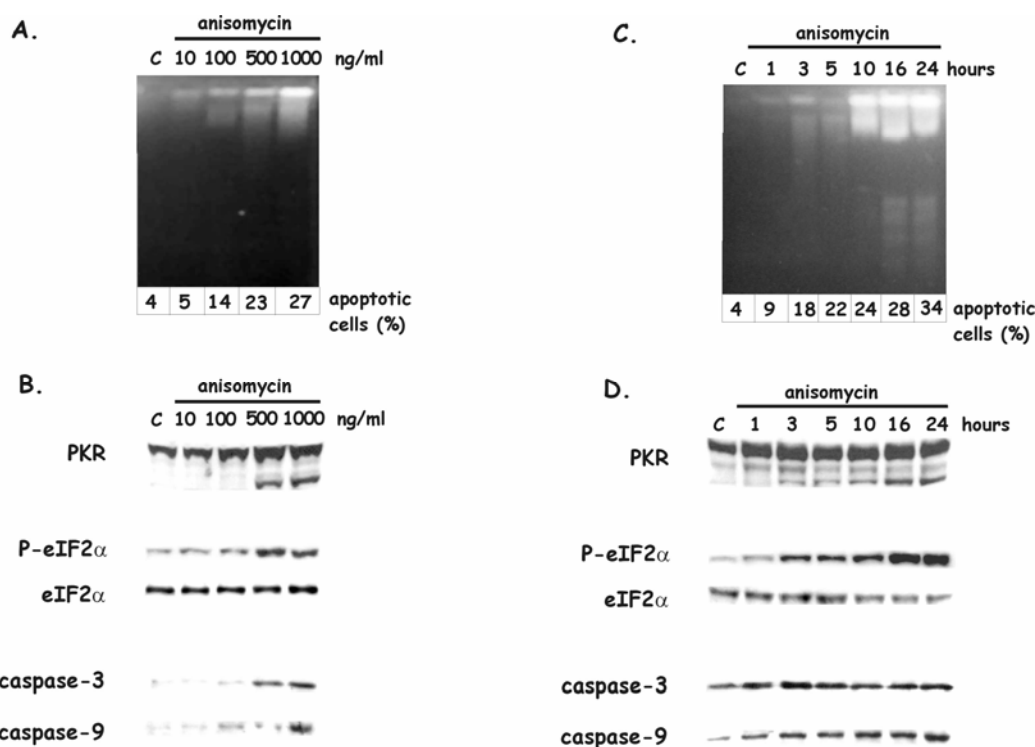
mutáns sejtvonalakban, azonban a vtPC12 sejtekkel összehasonlítva késleltetett időkinetikával (10. ábra). Hasonló hatású volt a nátrium-szalicilát kezelés is (ld. később). A RhoA-aktivitás tehát hozzájárulhat a sejtek túléléséhez, önmagában azonban nem elegendő az apoptózis kivédéséhez. (A RhoA PC12 sejtekben játszott szerepével foglalkozott Nusser Nóra PhD-disszertációja.)



10. ábra: Apoptotikus DNS-fragmentáció vtPC12 és V14RhoA-PC12 sejtekben (a kezelések 3 napig tartottak; A, 1 µg/ml anisomycin).

koncentráció felett mutatott. DNS-fragmentációs analízis és időlépteteses video-mikroszkópos morfológiai vizsgálatok is apoptotikus sejthalált igazoltak. Az apoptózist sem NGF, sem dbcAMP nem védte ki. A Na-szalicilát NFκB-utat gátló hatását gélretardációs analízissel mutattuk ki. Kísérleteink tehát igazolják az NFκB szerepét PC12 sejtek túlélésében. (További részleteket Kiss és mtsai, 2004 közleménye tartalmaz. A Na-szalicilát hatásának vizsgálata képezte Kiss Judit diplomamunkájának alapját.)

A celluláris stressz folyamatok vizsgálata hívta fel figyelmünket a protein kináz R (PKR) szerepére PC12 sejtek apoptózisában. Ezt az enzimet stressz-szignálok, növekedési faktorok aktiválják, sokféle sejtfolyamatban feltételezik szerepét (proliferáció, differenciáció, antivirális válasz, apoptózis). Aktiválása foszforiláció mellett proteolitikus hasítással történik.



11. ábra: Anisomycin-indukálta apoptózis és PKR-aktiváció PC12 sejtekben.

Munkánk ezen részében a PKR proteolitikus aktiválását vizsgáltuk apoptotizáló PC12 sejtekben. Minden vizsgált, apoptózishoz vezető kezelés (szérum-éheztetés, etopozid, ciszplatin, anisomycin, LY294002 kezelés) PKR hasítást eredményezett PC12 sejtekben. A PKR hasítás időben egybeesett az apoptotikus morfológiai változásokkal és DNS-fragmentációval. A hasítás aktiválta a PKR-t: az eIF2 α transzlációs iniciációs faktor foszforilációja szorosan korrelált a PKR-hasítással. A kaszpáz-3 proteolitikus aktivációja megelőzte vagy kísérte a PKR aktivációját. Eredményeink arra utalnak, hogy a kaszpáz-3/PKR/eIF2 α proteolitikus/foszforilációs kaszkád által előidézett fehérjeszintézis-gátlás fontos szerepet játszhat az apoptózis végrehajtó fázisában PC12 sejtekben. (A 11. ábra az anisomycin példáján mutatja be a fentieket. A munka eredményeit összefoglaló kézirat jelenleg elbírálás alatt van a J. Neurosci. Res. folyóiratnál /Pap, M., Szeberényi, J.: Involvement of proteolytic activation of protein kinase R in the apoptosis of PC12 pheochromocytoma cells/.)